

Untersuchungen
über fetomaternelle Mikrotransfusionen
bei transabdominaler Amniocentese

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von
PETER HINDEMANN
von Luzern

1966

VERLAG P. G. KELLER - 8053 ZÜRICH 1969

Aus der Universitäts-Frauenklinik Frankfurt am Main

Direktor: Prof. Dr. O. Käser

Arbeit unter Leitung von PD Dr. F. Kubli; Frankfurt a. M.

Untersuchungen über fetomaternelle Mikrotransfusionen bei transabdominaler Amniocentese

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

PETER HINDEMANN

von Luzern

VERLAG P. G. KELLER - 8053 ZÜRICH 1969

Von der Medizinischen Fakultät
genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. Th. Koller

Tag der Promotion: 22. Dezember 1966



Disposition

I. Einleitung und Fragestellung	5
II. Methodik	6
1. Der Nachweis von fetalem Blut im mütterlichen Kreislauf	6
a) Physiologische Vorbemerkungen	6
b) Methoden zum Nachweis von HbF	7
c) Die Elutionsmethode	8
d) Untersuchungen und Kritik zur Elutionsmethode	8
e) Die quantitative Auswertung	11
2. Technik der Amnionpunktion	12
III. Untersuchungsgut	13
IV. Ergebnisse	14
a) Häufigkeit der Einschwemmung	14
b) Ausmass der Mikrotransfusion	14
c) Häufigkeit der Einschwemmung (in Abhängigkeit von der Art der Punktion)	14
d) Art des bei der Punktion aspirierten Blutes	15
e) Häufigkeit, mit der bereits vor der Punktion fetale Zellen im mütter- lichen Blut gefunden wurden	15
V. Diskussion und Schlussfolgerungen	15
VI. Zusammenfassung	17
Tabellen	18
Literaturnachweis	19

I.

Einleitung und Fragestellung

Die transabdominale Amniocentese wurde vereinzelt bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts, allerdings stets aus therapeutischer Indikation, durchgeführt (Henkel, Wormser, Albano). In den letzten Jahren hat jedoch die transabdominale Amniocentese aus diagnostischer Indikation eine zunehmende Verbreitung erfahren. Neben der mütterlichen Östrogenausscheidung im 24-Stunden-Urin und der 1962 eingeführten Amnioskopie (Saling) bildet die transabdominale Amnionpunktion eine der wenigen diagnostischen Möglichkeiten zur Erkennung der fetalen Gefahrenzstände während der Schwangerschaft. So dient die abdominale Amnionpunktion zur Feststellung eines eventuellen Meconiumgehaltes des Fruchtwassers vor Geburtsbeginn und vor Blasensprung (Kubli) und zur Untersuchung des Säure-Basen-Haushaltes des Fruchtwassers (Schreiner). Weitaus am bedeutungsvollsten ist die Stellung dieses Verfahrens im Rahmen der antenatalen Diagnostik des Morbus haemolyticus neonatorum.

Heute, 15 Jahre nach der ersten Fruchtwasseruntersuchung bei diesem Krankheitsbild (Davis), kann kein Zweifel darüber bestehen, dass die Fruchtwasseranalyse die wichtigste und zuverlässigste diagnostische Massnahme bei der Beurteilung des Schweregrades der hämolytischen Fetalerkrankung bildet (Liley, Walker, Bevis, Mackay, Mayer, Kubli, Queenan, Freda). Andererseits ist jedoch die transabdominale Amnionpunktion kein absolut risikoloses Verfahren, und wenn man die heutige Stellung der Fruchtwasseruntersuchungen im Rahmen der antenatalen Diagnostik des Morbus haemolyticus beurteilen will, gehört dazu auch eine möglichst genaue Abschätzung der mit der Fruchtwasserentnahme verbundenen Risiken.

Zwei Gefahren sind dabei vor allem zu berücksichtigen:

1. Die Möglichkeit der Verletzung eines fetalen Gefässes in der Chorionplatte bei transplacentarer Punktion mit Verblutung des Feten in die Amnionhöhle. Derartige Todesfälle sind in der Literatur beschrieben (Parrish). Nach unserer Erfahrung lassen sich derartige Zwischenfälle bei nicht absichtlich transplacentaren Punktionen und unter Verwendung

einer dünnen Punktionsnadel weitgehend vermeiden. So sind bei bisher über 600 an unserer Klinik durchgeführten Punktionen keine lebensbedrohlichen fetalen oder mütterlichen Zwischenfälle vorgekommen. Auch Freda berichtet über 900 mit ähnlicher Technik durchgeführte Amnionpunktionen ohne einen ernsthaften Zwischenfall.

2. Die Auslösung fetomaterner Mikrotransfusionen, die zu einer vermehrten mütterlichen Sensibilisierung führen könnte. Dieses Gefahrenmoment ist sehr viel schwerer abzuschätzen. Dass diese Komplikation auftreten und von Bedeutung sein könnte, wurde zum erstenmal 1960 von Browne geäußert.

1963 publizierte Zipursky seine Untersuchungen, nach welchen bei 13 Amnionpunktionen in 4 Fällen zum Teil sehr massive Einschwemmungen (bis 50 ml) erfolgt sind. Dieser Arbeit folgte eine ziemlich rege Diskussion in der englischen Literatur, bei der zum Teil recht gegensätzliche Ansichten geäußert wurden (Hibbard, Fairweather, Finn).

Da die Zahl der von Zipursky untersuchten Fälle beschränkt ist, und eine Bestätigung seiner Ergebnisse in bezug auf Häufigkeit und Ausmass fetomaterner Mikrotransfusionen die diagnostische Anwendung dieses Verfahrens fraglich erscheinen liesse, stellten wir uns zur Aufgabe, an einem etwas grösseren Patientengut die Häufigkeit und das Ausmass fetomaterner Mikrotransfusionen nach transabdomineller Amnionpunktion zu untersuchen und erhofften uns davon auch eine Beantwortung der Frage, ob und, wenn ja, mit welcher Technik die transabdominale Amniocentese bei rhesus-negativen Patienten überhaupt durchgeführt werden sollte.

II.

Methodik

1. Der Nachweis von fetalem Blut im mütterlichen Kreislauf

Bei unseren Untersuchungen ging es darum, die fetalen Erythrocyten im mütterlichen Blut vor und nach der transabdominalen Amnionpunktion möglichst exakt qualitativ und quantitativ nachzuweisen.

a) Physiologische Vorbemerkungen

Der Unterschied zwischen erwachsenem und fetalem Hämoglobin beruht auf dem Aminosäureaufbau der Globine, in deren Anordnung und vielleicht auch in einer verschiedenen Bindung der Globine an das Häm.

Im Hämanteil sind sich die beiden Blutfarbstoffe gleich, auch weisen sie dasselbe Molekulargewicht auf. Auf dem unterschiedlichen Aminosäurenaufbau der beiden Globine beruhen die verschiedenen chemisch-physiologischen Eigenschaften von fetalem und mütterlichem Hämoglobin in bezug auf ihre Löslichkeit in Säuren, die elektrophoretische Mobilität und die unterschiedliche Resistenz gegenüber Alkali.

Bereits ziemlich früh im Fetalleben beginnt der Ersatz durch das Erwachsenen-Hämoglobin (HbA). Das HbA tritt neben dem HbF, also dem fetalen Hämoglobin, in derselben Zelle auf, jedoch in unterschiedlichem Mischverhältnis. Die Angaben in der Literatur über den Anteil von HbA und HbF im Neugeborenenblut schwanken stark. Während einige Autoren den HbA-Anteil bei Geburt mit 10—20 % angeben, beträgt die HbF-Konzentration nach Zipursky, Neelands und Pollock beim Frischgeborenen im Durchschnitt 65 % mit Schwankungen zwischen 79,4 und 49,4 %. In den ersten 4 Wochen nach der Geburt zeigen sich unter physiologischen Bedingungen keine wesentlichen Veränderungen in der prozentualen Zusammensetzung von HbA/HbF, was wohl Ausdruck des nahezu totalen Sistierens der Erythropoese beim Säugling zu diesem Zeitpunkt ist. Nach diesem Intervall beginnt die Produktion von HbA, während die HbF-haltigen Zellen aus dem Blutbild verschwinden, d. h. abgebaut werden.

Auf dem Wissen über die verschiedenen chemisch-physiologischen Eigenschaften von HbF und HbA beruht der Nachweis des eingeschwemmten fetalen Blutes in den mütterlichen Organismus.

b) Methoden zum Nachweis von HbF

aa) Serologisch

- Präcipitation: (Chernoff 1953);
- Direkte und indirekte Differentialhämolysen: (Todd u. White 1912);
- Gemischtagglutination: (Johes u. Silver);
- Nachweis mit fluoreszierenden Antikörpern: (Cohen).

bb) Alkalidenaturierung

(Krüger 1888).

cc) Säureelution

(Kleihauer, Braun u. Betke 1957).

Von diesen oben angeführten Möglichkeiten des HbF-Nachweises schien für unsere Untersuchungen die Methode der Säureeluierung nach Kleihauer, Braun und Betke, wo im Blutaussstrich die fetalen Erythrocyten histochemisch nachgewiesen werden, wegen ihrer deutlichen Spezifität, Zuverlässigkeit und Einfachheit am besten geeignet.

c) Die Elutionsmethode

Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, dass das Erwachsenen-Hämoglobin auf Grund seiner leichteren Löslichkeit in sauren Pufferlösungen aus den Erythrocyten ausgewaschen wird, während das resistere Hämoglobin im fetalen Erythrocyten zurückbleibt.

Zur Blutanalyse verwendeten wir liqueminisiertes Venenblut der Mutter, das auf einem fettfreien Objektträger zu einem feinen Film ausgestrichen wird. Dabei ist darauf zu achten, dass nicht zu viel Liquemin verwendet wird, da dieses sonst die Affinität des Blutes zum Objektträger stört. Der getrocknete Blutaussstrich wird 5 Min in 80 % Methylalkohol fixiert und nach Wässerung bei Zimmertemperatur getrocknet. Danach taucht man das Präparat zur Elution, am besten im Objektträgerhalter für 4—5 Min., senkrecht in einen Zitronensäure-Phosphatpuffer nach McIlvaine, der ein Ph von 3,2 aufweist und in einem Wasserbad von 37° auf konstanter Temperatur gehalten wird. Nach erneuter Wässerung des Präparates folgt eine Eosinfärbung des Pigmentes und eine Gegenfärbung der kernhaltigen Blutelemente mit Hämatoxylin nach Ehrlich. Im getrockneten Blutaussstrich erkennt man nun unter dem Mikroskop neben den glasklaren, eluierten Erythrocyten des erwachsenen Blutes und den Zellen des weissen Blutbildes die homogen rot gefärbten fetalen Erythrocyten.

d) Untersuchungen und Kritik zur Elutionsmethode

aa) Die Elutionsmethode:

Das Ph und die Molarität der Pufferlösung resp. die Molarität der einzelnen Komponenten des Puffers sind von grösster Wichtigkeit bei dieser Technik. Wie weiter oben erwähnt, ist der Gehalt an fetalem Hämoglobin und erwachsenem Hämoglobin in den einzelnen fetalen Erythrocyten unterschiedlich gross und schwankt von Fall zu Fall. Zipursky teilt auf Grund seiner Untersuchungen am eluierten Präparat, d. h. nach Auswaschen des HbA-Anteils aus den HbF-Zellen, die fetalen Erythrocyten nach dem Grad der verschiedenen Farbintensität in 5 Gruppen ein:

- Gruppe 4 = intensiv dunkelrot gefärbte Zellen;
- Gruppe 3 = rote Zellen;
- Gruppe 2 = Zellen mit rotem Zentrum und hellem Randsaum;
- Gruppe 1 = schwach rosa gefärbte Zellen;
- Gruppe 0 = glasklare Zellen ohne HbF.

Im Elutionspräparat nach Zipursky ergibt sich bei Verwendung einer 0,18 mol. Na_2HPO_4 -Lösung und einer 0,2 mol. Zitronensäurelösung bei einer Ph-Einstellung zwischen 3,48—3,52 folgende prozentuale Verteilung der einzelnen HbF-Zellgruppen:

Gruppe 3 und 4	ca. 71,5 %
Gruppe 2	ca. 14,5 %
Gruppe 1	ca. 8 %
Gruppe 0	ca. 6 %.

Anhand von Ph-Reihen (Ph 2,5—Ph 3,7) der einzelnen Pufferlösungen, bei denen wir jeweils mit der Molarität der einzelnen Komponenten (Na_2HPO_4 /Zitronensäure) variierten, haben wir gefunden, dass bei höherer Molarität der einzelnen Komponenten des Puffers sich das Auswaschungsoptimum des HbA gegen ein höheres Ph verschiebt.

Die Erwachsenenerythrocyten weisen im Gegensatz zu HbF-Zellen ein homogenes Farbbild auf, d. h. mit sinkendem Ph des Elutionspuffers blassen sie in toto langsam ab. Unter einem Ph von 3,25—3,2 sind die HbA-Zellen im Mikroskop nur noch als glasklare Schatten zu erkennen.

Auch die HbF-Zellen verlieren mit sinkendem Ph der Pufferlösung bei gegebener Molarität an Farbintensität. Bei einem Ph von 3,25 kann nach dem oben Gesagten angenommen werden, dass nahezu der gesamte HbA-Anteil bei frisch aufgearbeiteten Präparaten bei Einhalten der Fixationsdauer von 5 Min. in 80 % Methylalkohol eluiert wird. Unter einem Ph von 3,2 wird auch das fetale Hämoglobin zu einem Teil eluiert, bis bei einem Ph von 2,7 alles fetale Hämoglobin aus dem kindlichen Erythrocyten in Lösung geht und die Zellen wie die Erythrocyten von Erwachsenen als farblose Schatten gesehen werden.

Da wir nach der Originaltechnik von Kleihauer, Braun und Betke arbeiteten und als Stammlösungen 0,2 mol. Na_2HPO_4 und 0,1 mol. Zitronensäure verwendeten, lag unser Ph-Optimum bei 3,2.

Rechnet man mit Zipursky, dass die HbF-Konzentration im fetalen Blut zwischen 49,4 % und 79,7 % schwankt (Mittelwert 61 %) und rund 6 % der fetalen Zellen im Blutausschlag nicht fassbar sind, da sie kein HbF enthalten, so kommen bei der Originaltechnik nach Kleihauer bei einer Ph-Einstellung von 3,2 rund 94 % der fetalen Zellen zur Darstellung. Senkt man das Ph des Puffers auf 3,0—3,1, so fällt die Gruppe I, d. h. die bei normalem Ph von 3,2 noch schwach rosa gefärb-

ten HbF-Zellen, im Erscheinungsbild bereits unter die HbA-Zellen, was eine Reduktion der HbF-Erythrocyten von ca. 15 % oder mehr bewirkt.

Da es uns bei der quantitativen Erfassung der HbF-Zellen im Endzweck um das Sensibilisierungproblem geht, dies aber ein quantitatives Problem ist und nach dem heutigen Stand des Wissens bei einer Einschwemmung von 0,05 ml HbF-Zellen (Preisler und Schneider) eine Sensibilisierung möglich ist, glauben wir auf Grund unserer Untersuchungen, dass die Einstellung auf ein Ph von 3,2 optimal ist, um möglichst die Gesamtzahl der eingeschwemmten Erythrocyten zu erfassen.

Das Ph der Pufferlösung wurde bei unseren Untersuchungen jeweils sorgfältig mit dem „Astrup-Ph-Messgerät“ überprüft. Eine Verschiebung des Ph, auch nach mehrmaliger Verwendung derselben Pufferlösung, konnte nicht beobachtet werden. Jedoch empfiehlt es sich, die Pufferlösung wegen der Pilzbildung im Kühlschrank aufzubewahren.

Die oben erwähnten Ausführungen zur Elutionstechnik gelten für frisch aufgearbeitete Ausstriche. Durch längeres Trockenlassen oder eine längere Alkoholfixation verliert das Hämoglobin an Löslichkeit.

bb) Die Färbung:

Bei der Kleihauermethode wird zur Färbung der eluierten Präparate Eosin und Hämatoxylin nach Ehrlich verwendet. Diese von Kleihauer 1957 angegebene Originaltechnik wurde von verschiedenen Autoren wie Zipursky, Martioli, Clayton, Freese und Finn erprobt und sowohl im Elutionsverfahren wie in der Färbetechnik modifiziert, z. T. in der Absicht, eine mögliche Verwechslung der HbF-Zellen mit Reticulocyten, die bei der Methode von Kleihauer mit zur Darstellung gelangen, auszuschliessen.

Um uns mit dem Erscheinungsbild der Reticulocyten im Kleihauerpräparat vertraut zu machen, haben wir vergleichende Untersuchungen an Blutausstrichen von nichtschwangeren Patienten gemacht, die wegen gynäkologischer Blutungen in unserer Klinik lagen. Je ein Präparat wurde nach der Kleihauertechnik eluiert und anschliessend mit Eosin-Hämatoxylin gefärbt, das Vergleichspräparat mit einer spezifischen Reticulocytenfärbung (Brillantkresyl) aufgearbeitet. Sodann wurden die Reticulocyten in den entsprechenden Präparaten in 2 000 Erythrocyten gezählt.

Während die Reticulocyten bei der Brillantkresylfärbung basophile Körnchen und Fäden aufweisen, sind die Reticulocyten im Kleihauerpräparat unter dem Mikroskop bei einer Vergrösserung von 1:80 neben den glasklaren ausgewaschenen Erwachsenenerythrocyten als schwach rosa gefärbte Zellen zu erkennen und können Anlass zur Verwechslung

mit HbF-Zellen geben. Bei stärkerer Vergrößerung (1:320) weisen jedoch die Reticulocyten im Kleihauerpräparat im Gegensatz zu den HbF-Zellen — die homogen gefärbt sind — eine inhomogene Färbung auf und lassen eine feine Granulation erkennen. Beim Spiel mit der Mikrometerschraube leuchten die Granulationen wie kristalline Einlagerungen rot auf.

Die Vergleichszählung der inhomogen gefärbten Zellen im Kleihauerpräparat mit dem entsprechenden Präparat, das mit Brillantkresyl gefärbt wurde, bestätigte unsere Vermutung, dass es sich dabei tatsächlich um Reticulocyten handelt. Die quantitative Auswertung der jeweiligen Vergleichspräparate ergab eine weitgehende Übereinstimmung der Reticulocytenwerte (Tabelle 1).

Auf Grund unserer Untersuchungen über die Säureeluierung und das Färbeverfahren sind wir zur Ansicht gelangt, dass die histochemische Methode nach Kleihauer, Braun und Betke in der Originaltechnik bei genügender Routine für unsere Untersuchungen geeignet ist.

Die Tatsache, dass bei rund 0,1 % gesunder nichtschwangerer Erwachsener mit der Kleihauermethode ebenfalls vereinzelt HbF-haltige als fetale Erythrocyten imponierende Zellen gefunden werden, fällt hier nicht ins Gewicht, da bei unseren Untersuchungen nur eine Zunahme des HbF-Zellgehaltes durch die Amniocentese zur Frage stand und zu diesem Zweck das Blut der Patienten in jedem Fall kurz vor, 30 Min. nach und, wenn möglich, 24 Std. nach der Punktion auf den Gehalt von fetalen Erythrocyten untersucht wurde.

e) Die quantitative Auswertung

Die meisten Autoren begnügen sich mit einer Schätzung des eingeschwemmten fetalen Blutes, indem sie die fetalen Erythrocyten im Blutaussstrich bei einer 10-Min.-Durchmusterung auszählen und den erhaltenen Wert anhand von genormten Tabellen vergleichen. Die Tabellen wurden jeweils anhand von mengenmässig bekannten Versuchsinjektionen beim Erwachsenen aufgestellt. Andere Autoren verfahren nach dem Reticulocyten-Zählsystem. Wir verwendeten für unsere Untersuchungen das für diesen Zweck eigens entwickelte Zählsystem nach Schneider und Ludwig. Dabei werden mittels eines Okularmikrometernetzes und eines Deckglaszählnetzes, das gegen das starre Mikrometernetz verschoben wird, die fetalen Erythrocyten gegen die ausgewaschenen Erwachsenenerythrocyten ausgezählt und anhand einer Formel auf Promillwerte (HbF/HbA) umgerechnet. Bei bekanntem Blutvolumen der Mutter (z. B. 5 Liter) können dann die absoluten Werte errechnet werden. Die

Methode ist bei dicken Ausstrichen und bei HbF-Werten unter 0,1 % zeitraubend, erlaubt jedoch eine exakte Aussage über Einschwemmungen im Bereich von 0,05—50 ml mit einer Fehlerbreite von + 20 % (Schneider) und ist die bis heute exakteste Methode zur Bestimmung feto-materneller Mikrotransfusionen.

In einer kleinen Fallzahl haben wir die Genauigkeit der Zählmethode überprüft, indem der eine von uns rhesus-positiven freiwilligen Versuchspersonen eine kleine Menge blutgruppengleiches Nabelschnurblut injizierte, und der andere von uns diese (ihm unbekannte) Menge nachträglich auf Grund des mütterlichen Blutaussstriches zu ermitteln suchte. Die Resultate sind in Tabelle 2 zusammengefasst. In 5 von 6 Fällen lag das Resultat innerhalb der angegebenen Fehlergrenzen von + 20 %. Im 6. Fall, in welchem eine relativ grosse Menge fetalen Blutes injiziert wurde, lag der Fehler bei weitem höher. Möglicherweise wird die quantitative Erfassung bei steigenden fetalen Blutmengen ungenauer; von Bedeutung für unsere Arbeit ist jedoch die Tatsache, dass eine Unterschätzung der in die mütterliche Blutbahn eingeschwemmten fetalen Blutmenge nur selten vorkommen dürfte.

2. Technik der Amnionpunktion

Die Einzelheiten der Technik sind an anderer Stelle beschrieben (Kubli 1962). Wir führten die Punktion in Lokalanästhesie durch und verwendeten dazu eine 10 cm lange Nadel mit einem äusseren Durchmesser von 0,8 mm. In der Regel wählten wir nach vorheriger Bestimmung der Kindslage als Einstichstelle die Mitte der Verbindungslinie von Nabel zur Spina ilica ventralis auf der Seite der kleinen Teile. Wenn wir dort in den intervillösen Raum einer Vorderwandplacenta gerieten oder aus anderen Gründen kein Fruchtwasser aspirieren konnten, wechselten wir auf die andere Seite über.

Im Rahmen unserer Untersuchungen versuchten wir zum Zeitpunkt des Eingriffes festzustellen, ob eine Punktion transplacental durchgeführt war oder ob es sich um eine nichttransplacentare Funktion der Amnionhöhle oder etwa nur um eine Punktion des intervillösen Raumes handelte. Dabei gingen wir von folgenden Voraussetzungen aus: Bei der Punktion lässt sich der Moment, in welchem die Nadel in die Uterusmuskulatur eintritt, mit grosser Regelmässigkeit durch einen vermehrten Widerstand und einen vermehrten Peritonealschmerz der Mutter feststellen. Der Zeitpunkt, zu welchem die Nadelspitze die Uterusmuskulatur durchquert hat, ist zwar etwas weniger eindeutig festgelegt, lässt sich aber bei einiger Erfahrung in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle an

einem eindeutigen Nachlassen des Widerstandes feststellen. Wenn wir in diesem Moment Fruchtwasser aspirieren konnten, bezeichneten wir die Punktion als nichttransplacental. Aspirierten wir zu diesem Zeitpunkt oder nach leichtem Zurückziehen der Nadel Blut, so stuften wir die Punktion als Punktion des intervillösen Raumes ein. Dabei sind wir uns im klaren, dass wir wahrscheinlich nicht in jedem Fall tatsächlich mit der Nadelspitze im retroplacentaren Raum lagen. Es kann sich auch um Blut aus einer Uterusvene gehandelt haben. Nach den Erfahrungen von Alvarez (persönliche Mitteilung), der bei dieser Situation in 95 % der Fälle jeweils eine positive Placentabiopsie erhielt, muss man annehmen, dass man sich unter diesen Umständen fast immer entweder im intervillösen Raum oder an der vermehrt vaskularisierten Insertionsstelle der Placenta befindet. Bei 12 (rh-positiven) Patienten führten wir absichtlich eine transplacentare Punktion durch. In einem Teil der Fälle liess sich allerdings nicht entscheiden, ob transplacental oder nichttransplacental punktiert worden war.

Im Laufe der Punktion aspiriertes Blut wurde, wenn immer möglich, auf seinen HbF-Gehalt untersucht.

III.

Untersuchungsgut

Bei 60 transabdominalen Amniocentesen an 50 Patienten wurde das mütterliche Venenblut auf das Vorkommen HbF-haltiger Erythrocyten untersucht, und zwar jeweils kurz vor, 30 Minuten nach und — wenn möglich — 24 Stunden nach der Punktion.

Die *Indikationen zur Punktion* waren:

Mütterliche Rhesus-Sensibilisierung	26 Fälle
Terminüberschreitung	16 Fälle
Toxikose	11 Fälle
Diabetes	6 Fälle
Vermuteter intrauteriner Fruchttod	1 Fall

Nach der *Art der Punktion* wurden die Fälle folgendermassen eingestuft:

Nicht transplacental	26
Transplacental	12
Punktion des intervillösen Raumes	14
Fraglich transplacental	8

Die *mütterliche Blutgruppe* war in den 50 Fällen:

Blutgruppe o	17 Fälle
Blutgruppe A	29 Fälle
Blutgruppe B	3 Fälle
Blutgruppe AB	1 Fall

Die kindliche Blutgruppe stellten wir nur in einem Teil der Fälle fest. Danach befanden sich unter den untersuchten Fällen 3 Fälle mit einer gesicherten ABO-Dissonanz und 9 Fälle, bei denen eine ABO-Dissonanz nicht auszuschliessen ist.

IV.

Ergebnisse (siehe Tabelle)

a) Häufigkeit der Einschwemmung:

Wir fanden eine Einschwemmung nach 5 der 60 Punktionen, was einer prozentualen Häufigkeit von knapp 10 % entsprechen dürfte.

b) Ausmass der Mikrotransfusion:

Die Menge schwankte zwischen 0,8 und 1,62 ml und überschritt nur in zwei Fällen 1,0 ml.

c) Häufigkeit der Einschwemmung (in Abhängigkeit von der Art der Punktion).

Bei nichttransplacenter Punktion (26 Fälle) fanden wir in keinem Fall eine fetomaternal Mikrottransfusion. Bei transplacenter Punktion trat in 3 von 12 Fällen, also in etwa $\frac{1}{4}$ der Fälle, eine fetomaternal Mikrottransfusion auf. Bei der Punktion der intervillösen Raumes fand sich nur einmal in 14 Fällen eine positive Einschwemmung. Dabei handelte es sich um einen besonderen Fall. Bei dieser Patientin wurde nach einem negativen Punktionsversuch die Isotopenplacentografie durchgeführt. Es handelte sich dabei um die erste Placentografie, die an unserer Klinik gemacht wurde. Sie war noch technisch unvollkommen und führte zu einem falschen Ergebnis. Auf Grund dieses falschen Placentografieergebnisses wurde versucht, an einer fälschlicherweise als placentafrei bezeichneten Stelle die Punktion zu erzwingen. Da wir dennoch kein Frucht-

wasser erhielten, musste die Punktion klinisch als Punktion des intervillösen Raumes eingestuft bleiben. Die dabei ausgelöste fetomaternelle Transfusion war in ihrem Ausmass die grösste von uns beobachtete (1,62 ml). Das Kind erwies sich glücklicherweise nach der Entbindung als rhesus-negativ.

Bei den fraglich transplacentaren Punktionen trat einmal auf 8 Punktionen eine Einschwemmung auf.

d) Art des bei der Punktion aspirierten Blutes

Bei 16 Punktionen wurde im Verlauf des Eingriffes Blut aspiriert. Die Analyse dieses Blutes ergab 9mal rein mütterliches Blut. Bei 7 Punktionen ergab die Untersuchung des aspirierten Blutes entweder rein fetales (4 Fälle) oder Mischblut (3 Fälle), d. h. der fetale Kreislauf wurde eröffnet.

Unter diese 7 Punktionen fallen unsere 5 Fälle mit positiver fetomaternereller Transfusion.

e) Häufigkeit, mit der bereits vor der Punktion fetale Zellen im mütterlichen Blut gefunden wurden:

Bei 9 Patienten (18 %) ergab die Kontrolle der Blutaussstriche bereits vor der Punktion eine Einschwemmung von fetalen Erythrocyten in den mütterlichen Organismus. Bei zwei dieser 9 vor der Punktion positiven Fälle konnte bei Wiederholung der Punktion im Abstand von einer Woche kein fetales Blut mehr gefunden werden. Es bestand in beiden Fällen eine ABO-Dissonanz zwischen Mutter und Kind.

V.

Diskussion und Schlussfolgerungen

Neben Fehltransfusionen ist die Schwangerschaft und Geburt die bis heute einzig bekannte Möglichkeit, eine rhesus-negative Mutter mit dem Rhesusantigen zu sensibilisieren. Theoretisch kommen für die Sensibilisierung der Mutter ausser den fetalen rh-positiven Erythrocyten noch gelöste Antigene sowie in den mütterlichen Organismus verschlepptes Throphoblastenmaterial in Frage (Dördelmann). Allerdings ist man heute weitgehend der Meinung, dass bei einer Rhesusinkompatibilität der Placenta keine antigene Wirkung zuzuschreiben ist (Preisler, Martius). Wenn man auch gelöste Rhesusantigene in Drüsensekreten und, was viel-

leicht von grösserer Bedeutung sein könnte, in der Amnionflüssigkeit gefunden hat, ist man heute doch der Meinung, dass die rhesus-positiven Erythrocyten die Hauptträger des Rhesusantigens sowohl in qualitativer wie in quantitativer Hinsicht sind, und dass die fetomaternelle Mikrotransfusion von rhesus-positivem Blut die Hauptgefahr der Sensibilisierung darstellt.

Bei unseren 60 untersuchten Punktionen trat fünfmal eine fetomaternelle Mikrotransfusion auf. Die Frequenz beträgt demnach knapp 10 %. Damit ist die Häufigkeit, mit welcher Ausschwemmungen nach Amnionpunktionen auftreten, etwa halb so gross wie nach Spontangeburt, nach welchen von den meisten Untersuchern zwischen 20 und 30 % der Fälle angegeben werden (Preisler, Clayton, Freese etc.).

Dabei zeigte sich bei unseren Untersuchungen, dass die Mehrzahl der Ausschwemmungen bei absichtlich transplacentarer Punktion auftraten. Rechnet man diese Fälle ab, so findet man noch zwei Ausschwemmungen auf 48 Punktionen, was einem Prozentsatz von knapp 5 % entspricht. Von Interesse scheint uns weiterhin die Tatsache, dass bei einer einfachen Punktion des intervillösen Raumes, die nicht durch forcierte Bemühungen zur Erreichung einer positiven Funktion kompliziert ist, Einschwemmungen von fetalem Blut sehr selten sind. So haben wir in 14 Fällen nur eine Einschwemmung gefunden, wobei dieser Fall noch durch den erfolglosen Versuch einer transplacentaren Punktion kompliziert war.

Betrachtet man die Mengen des fetalen Blutes, die ausgeschwemmt wurden, so waren diese durchwegs gering und dürften keine Bedrohung für das fetale Leben darstellen.

Unsere Resultate stehen in einem gewissen Gegensatz zu denen Zipurskys, und zwar sowohl in bezug auf die Häufigkeit wie auch auf das Ausmass der Ausschwemmung. Dieser Unterschied mag sich zum Teil durch eine verschiedene Technik der Amniocentese erklären, wobei wir annehmen, dass bei Zipurskys Fällen möglicherweise eine dickere Nadel verwendet wurde und dass er versuchte, eine erfolgreiche Punktion unter allen Umständen zu erzwingen. Wir glauben daher, dass der Technik, mit welcher die Amniocentese durchgeführt wird, eine wichtige Bedeutung zukommt. Ausserdem glauben wir, dass es bei sehr schwerer hämolytischer Fetalenkrankung durchaus auch zu Einschwemmungen grösseren Ausmasses kommen kann, da in diesen Fällen der erhöhte venöse Druck im fetalen Kreislauf die fetomaternelle Transfusion begünstigen wird.

Die Bedeutung, die solchen fetomaternellen Mikrotransfusionen zukommt, auch wenn sie das von uns gefundene geringe Ausmass aufweisen, scheint erwiesen. Nach Zipursky werden durchschnittlich 1,3 ml zur Erstsensibilisierung und 0,1 ml zur Resensibilisierung gebraucht. Schnei-

der und Kleihauer glauben anhand ihrer Untersuchungen, dass beim Menschen eine Menge von 0,5 ml rhesus-positives Blut zur Erstsensibilisierung bereits ausreicht. Offensichtlich genügen auch kleinere Mengen, denn Preisler konnte mit 0,1 ml fetalen Blutes, die er 14 freiwilligen Versuchspersonen injizierte, in einem Fall nach einmaliger Injektion bereits eine Erstsensibilisierung bewirken. Dass eine Erstsensibilisierung mit den im Tierversuch ermittelten minimalen Mengen von 0,02—0,06 ml Erythrocytensuspension (Levine und Wiener) beim Menschen auch möglich ist, ist bisher noch nicht erwiesen. Auf Grund dieser heute in der Literatur vorhandenen Angaben über die minimale für eine Rh-Sensibilisierung notwendige Blutmenge muss man annehmen, dass fetomaternele Mikrotransfusionen vom Ausmass, wie wir sie bei unseren Amnionpunktionen feststellen konnten, in den meisten Fällen für eine Verstärkung einer bestehenden Sensibilisierung ausreichen, während sie zur Auslösung einer Erstsensibilisierung in drei der von uns durchgeführten und kontrollierten Fälle ausreichen dürften. Eine Verstärkung der Sensibilisierung würde eine Intensivierung der fetalen Erkrankungen in den darauffolgenden Schwangerschaften zur Folge haben. Man muss an dieser Stelle allerdings betonen, dass bisher von keiner Seite in statistisch einwandfreier Weise bewiesen werden konnte, dass nach einer Amniocentese die Prognose der in Frage stehenden oder der folgenden Schwangerschaften schlechter geworden sei. So konnten Fairweather und Mitarbeiter bei sorgfältiger Untersuchung keinen Unterschied zwischen Frauen, bei denen eine Amnionpunktion durchgeführt wurde, und einer Kontrollgruppe ohne Amnionpunktion finden. Dennoch bleibt die Tatsache bestehen, dass bei der transabdominalen Amniocentese, und zwar fast ausschliesslich bei der transplacentaren Fruchtwassergewinnung, fetomaternele Mikrotransfusionen auftreten können, die nach den heutigen Kenntnissen eine mütterliche Sensibilisierung zu verstärken imstande sind. *Es ergibt sich hieraus für uns die Folgerung, die transplacentare Punktion bei rh-negativen Patientinnen nach Möglichkeit zu vermeiden!* Es erhebt sich dann allerdings die Frage, wie diese Forderung auf eine möglichst rationelle Weise erfüllt wird. Einige Untersucher, wie Freda und Hibard, befürworten in jedem Falle eine vorangehende Lokalisation der Placenta mittels Isotopenplacentografie. Obwohl die fetale und mütterliche Strahlenbelastung dabei minimal ist (Weinberg), führen wir im gegenwärtigen Zeitpunkt eine routinemässige Isotopenplacentografie vor der Amnionpunktion nicht durch.

Gestützt auf die eben besprochenen Untersuchungen verwenden wir heute eine Technik der transabdominalen Amniocentese, die unseres Erachtens auf rationelle Weise nicht nur lebensgefährliche fetale Komplikationen vermeiden lässt, sondern auch die Frequenz der fetomaternellen

Mikrotransfusionen auf ein Minimum beschränken dürfte. Dabei gehen wir folgendermassen vor: Nach dem Rat von Liley und Bineiaz (persönliche Mitteilungen) versuchen wir stets, die Placenta durch einfache äussere Palpation zu lokalisieren. Dieses gelingt erstaunlicherweise in beinahe der Hälfte der Fälle. Bei den restlichen Fällen versuchen wir eine Probepunktion, und zwar nötigenfalls an verschiedenen Orten. Die psychische Belastung der Patientin ist bei einem solchen Vorgehen erfahrungsgemäss gering. Bei einer eventuellen Vorderwandplacenta wird die Probepunktion nach Möglichkeit nicht weiter als in den intervillösen Raum geführt, d. h. wenn wir nach Durchqueren der Uteruswand Blut aspirieren, wird die Punktion an dieser Stelle abgebrochen. Führt auch dieses Verfahren nicht zum Ziel, so lokalisieren wir die Placenta mit Jod 131. Bei diesem Vorgehen sind es gegenwärtig etwa 10—20 % aller in Frage kommenden sensibilisierten rh-negativen Patientinnen, die wir der Isotopenplacentografie zuführen müssen. Zu betonen ist dabei allerdings, dass der Begriff Probepunktion nur so zu verstehen ist, dass nach Durchquerung der Uterusmuskulatur ein einmaliger Aspirationsversuch, eventuell unter Drehung und unter Zurückziehen der Nadel, durchgeführt wird, und nicht mit der Nadel längere Zeit in einem Bereich blind herumgebohrt wird, in welchem möglicherweise die Placenta sitzt. Ein solches Vorgehen hätte ohne Zweifel eine relativ hohe Frequenz von Ausschwemmungen zur Folge. Schliesslich legen wir grossen Wert auf eine dünne Punktionsnadel (äusserer Durchmesser 0,8 mm), sofern der Sitz der Placenta nicht sicher bekannt ist, und darauf, dass man bei dringend erforderlicher Fruchtwasseruntersuchung eine positive Punktion nur dann durchführt, wenn die Placenta vorher einwandfrei, in der Regel radiologisch, lokalisiert worden ist.

Wenn wir abschliessend die anfangs gestellte Frage, ob eine Amnionpunktion bei der rh-negativen Schwangeren überhaupt noch angezeigt ist, beantworten sollen, so kommen wir auf Grund unserer Untersuchungen und dem heutigen Stand des Wissens zu dem Schluss, dass eine Amniocentese aus rein wissenschaftlicher Indikation abgelehnt werden sollte. Ungeachtet dieser Einschränkung sind wir der Überzeugung, dass für diagnostische Zwecke bei einer bestehenden Rhesussensibilisierung die transabdominale Amnionpunktion, solange keine ungefährlichere Methode der Fruchtwassergewinnung gefunden ist, indiziert bleibt. Dabei sollte jedoch auf eine sorgfältige Technik geachtet werden. Zur Selbstkontrolle des Geburtshelfers empfiehlt es sich, bei allen Amnionpunktionen das Blut der Schwangeren auf eine fetale Erythrocyten-Einschwemmung zu untersuchen.

VI.

Zusammenfassung

1. Bei 60 transabdominalen Amnionpunktionen (50 Patientinnen) wurde das mütterliche Venenblut auf fetale Erythrocyteneinschwemmung jeweils kurz vor, 30 Min. nach und wenn möglich 24 Std. nach der Punktion mit dem Elutionsverfahren nach Kleihauer, Braun und Betke untersucht. Bei positivem Resultat wurde die Einschwemmung nach der Methode von Schneider und Ludwig quantitativ ausgezählt.
2. 5mal trat eine fassbare fetomaternelle Mikrotransfusion auf. Dies entspricht einer Frequenz von knapp 10 %. Das Ausmass der Mikrotransfusionen war gering und lag zwischen 0,08 und 1,62 ml.
3. Eine fetomaternelle Mikrotransfusion trat relativ häufig (3 auf 12 Fälle) auf, wenn absichtlich transplacentar punktiert wurde. Bei Vermeidung einer absichtlichen transplacentaren Punktion betrug die Frequenz der Ausschwemmung 2 auf 48.
Bei der einfachen Punktion des intervillösen Raumes war die Häufigkeit der Ausschwemmung gering, nämlich einmal auf 14.
4. Es ergibt sich daraus die Notwendigkeit, eine transplacentare Punktion bei rh-negativen Schwangeren zu vermeiden. Die an unserer Klinik besonders in dieser Hinsicht ausgearbeitete Technik der transabdominalen Amniocentese wird besprochen.
5. Die transabdominale Amniocentese sollte bei rh-negativen Schwangeren aus wissenschaftlichen Gründen allein nicht durchgeführt werden. Hingegen bleibt ihre Durchführung im Rahmen der antenatalen Diagnostik des fetalen Morbus haemolyticus durchaus berechtigt. Dabei ist aber auf eine sorgfältige und die Placenta nicht traumatisierende Technik zu achten.

Tabelle 1

Reticulocyten-Vergleichszählung

<i>Patientin</i>	<i>Brilliantcresyl-Methode</i>	<i>Kleihauer-Methode</i>
A. F.	22 ‰	18 ‰
P. A.	23 ‰	25 ‰
M. A.	35 ‰	30 ‰
B. M.	27 ‰	26 ‰
F. G.	38 ‰	43 ‰

Tabelle 2

Untersuchungen über die quantitative Erfassung fetaler Erythrocyten nach Injektion von Nabelschnurblut bei sechs freiwilligen Patienten

<i>Patientin</i>	<i>Injizierte Menge</i>	<i>Quantitativer Nachweis im Blutaussstrich (nach Schneider u. Ludwig)</i>	
1. L. M.	0,55 ml	0,120 ‰	0,60 ml
2. H. D.	1,50 ml	0,270 ‰	1,35 ml
3. L. F.	2,00 ml	0,364 ‰	1,82 ml
4. S. G.	2,00 ml	0,380 ‰	1,90 ml
5. B. G.	3,00 ml	1,280 ‰	6,40 ml
6. B. P.	5,00 ml	0,824 ‰	4,12 ml

Tabelle 3

Tabellarische Zusammenfassung der Einschwemmung von HbF-Zellen in den mütterlichen Kreislauf bei 60 Amnionpunktionen

<i>Punktionen</i>	<i>Zahl</i>	<i>Einschwemmung</i>		<i>Menge + 20 ‰</i>
		<i>ja</i>	<i>nein</i>	
Nicht transplacentar	26	—	26	—
Transplacentar	12	3	9	0,08 ml 0,07 ml 1,08 ml
Fraglich transplacentar	8	1	7	0,16 ml
Intervillöser Raum	14	1	13	1,62 ml

Literaturnachweis

1. *Alvarez, H.*: (Persönliche Mitteilung).
2. *Berger, M.*: Transabdominale Amniocentese. *Gynaecologia* 159 (1965), 277.
3. *Bevis, D. C. A.*: Composition of Liquor Amnii in Haemolytic Disease of the Newborn. *Lancet* II. (1950), 443.
4. *Bieniarz, J.*: (Persönliche Mitteilung).
5. *Fairweather, D. V. I., et al.*: Possible Immunological Implications of Amniocentesis. *Lancet* II. (1963), 1190.
6. *Finn, R., Clarke, C. A., et al.*: Experimental Studies on the Prevention of Rh-Haemolytic Disease. *Brit. M. J.* 1 (1961), 1486.
7. *Finn, R., Durkin, C. M.*: Transplacental Foetal Blood-Loss (Letter to the Editor). *Lancet* II. (1963), 685.
8. *Freda, V. J.*: The Rh-Problem in Obstetrics and a New Concept of its Management Using Amniocentesis and Spectrophotometric Scanning of Amniotic Fluid. *Amer. J. Obstet. Gyn.* 92 (1965), 341.
9. *Goodlin, R. C.*: Diagnostic Abdominal Amniocentesis. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 88 (1964), 1090.
10. *Hibbard, B. M.*: Transplacental Foetal Blood-Loss (Letter to the Editor). *Lancet* II. (1963), 642.
11. *Jennison, R. F., Walker, A. H. C.*: Amniocentesis (Letter to the Editor). *Lancet* II. (1963), 1387.
12. *Kleihauer, E., H. Braun, K. Betke*: Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutaussstriches. *Klin. Wschr.* 25 (1957), 637.
13. *Kubli, F.*: Indikation, Technik und klinische Interpretation der abdominalen Amnionpunktion. *Geb. Fra.* 22 (1962), 134.
14. *Kubli, F.*: Fetale Gefahrenzustände und ihre Erkennung. Thieme Verlag, Stuttgart 1966.
15. *Liley, A. W.*: Liquor Amnii Analysis in the Management of the Pregnancy Complicated by Rhesus Sensitization. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 82 (1961), 1359.
16. *Liley, A. W.*: The use of Amniocentesis and Fetal Transfusion in Erythroblastosis Fetalis. *Pediatrics* 35 (1965), 836.
17. *Liley, A. W.*: (Persönliche Mitteilung).
18. *Mayer, A.*: L'examen du liquide amniotique dans le pronostic antenatal de l'erythroblastose foetal. III. Weltkongress, Wien 1961: Berichte Bd. 3, 360.
19. *Moncrieff, A.*: Haemolytic-Disease of the Newborn. *J. Obstetr. Gynec. Brit. Emp.* 67, 5 (1960), 740.
20. *Preisler, O., und J. Schneider*: Die Prophylaxe der Sensibilisierung der rh-neg. Frau mit Anti-D-Serum und Anti-D-Globulin: Kubli, F., und Spielmann, W: Neuere Gesichtspunkte zur Prophylaxe und Therapie des Morbus Haemolyticus. Karger, Basel, New York 1966.

21. *Queenan, J. T., Adams, D. W.*: Amniocentesis for Prenatal Diagnosis of Erythroblastosis Fetalis. *Obstet. Gynec.* 25 (1965), 302.
22. *Robertson, J. G.*: Examination of Amniotic Fluid in Rhesus Isoimmunization. *Brit. Med. J.* 2 (1964), 147.
23. *Saling, E.*: Die Amnioskopie, ein neues Verfahren zum Erkennen von Gefährenzuständen des Feten bei noch stehender Blase. *Geb. Fra.* 22 (1962), 830.
24. *Schneider, J., und G. A. Ludwig*: Eine neue Zählmethode zur Erfassung kleinster Mengen fetaler, in den mütterlichen Kreislauf eingeschwemmter Erythrocyten. *Klin. Wochr.* 47 (1963), 11.
25. *Schneider, J., und G. Schoff*: Die fetomaterne Mikrotransfusion während des Geburtsverlaufs. *Zentralbl. Gyn.* 42 (1964), 1829.
26. *Schreiner, W. E.*: Fruchtwasser und Fetus. Karger-Verlag, Basel, New York (1964).
27. *Thomsen, K., und G. Bettendorf*: Indikationen und Gefahren der Amniocentese. Referat, gehalten an der 66. Tagung der Nordwestdeutschen Gesellschaft für Gynäkologie (1965).
28. *Walker, A. H. C.*: Liquor Amnii Studies in the Prediction of Haemolytic Disease of the Newborn. *Brit. Med. J.* 2 (1957), 376.
29. *Walker, W., Fairweather, D. V. I., and Jones, P.*: Examination of Liquor Amnii as a Method of Predicting Severity of Haemolytic Disease of Newborn. *Brit. Med. J.* 2 (1964), 141.
30. *Weinberg, A., Shapiro, G., and Bruhn, D. F.*: Isotopic Placentography. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 87 (1963), 203.
31. *Westberg, J. A., Margolis, A. J.*: Amniotic Fluid Evaluation and Intrauterine Transfusion for Erythroblastosis Fetalis. *Amer. J. Obst. Gyn.* 92 (1965), 583.
32. *Wiener, A. S.*: Competition of Antigens in Isoimmunization by Pregnancy. *Proc. Soc. Exper. Biol. u. Med.* 58 (1945), 113.
33. *Wimböfer, H., Schneider, J., und F. Leidenberger*: Untersuchungen über die Einschwemmung fetaler Erythrocyten in den mütterlichen Kreislauf bei Spontan- geburten und geburtshilflichen Eingriffen. *Geb. Fra.* 22,7 (1962), 589.
34. *Zipursky, A., Hull, A., White, F. D., and Israels, L. G.*: Foetal Erythrocytes in the Maternal Circulation. *Lancet I.* (1959), 451.
35. *Zipursky, A., et al.*: The Transplacental Passage of Foetal Red Bloodcells and the Pathogenesis of Rh-Immunisation. *Lancet I.* (1963), 489.
36. *Zipursky, A., J. Polloch, B. Chown and L. G. Israels*: Transplacental Foetal Haemorrhage after Placental Injury during Delivery or Amniocentesis. *Lancet II.* (1963), 493.

